Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. Dr. W. N e u m a n n

B e i t r ä g e z u r K e n n t n i s d e r W i r k u n g t i e r i s c h e r G i f t e a u f d i e D e h y d r i e r u n g v o n B e r n s t e i n s ä u r e i m R i n d e r h i r n h o m o g e n a t

INAUGURAL-DISSERTATION

verfaßt und der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

der

JULIUS MAXIMILIANS - UNIVERSITÄT WÜRZBURG

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Siegfried Seifert

aus Eisfeld

Würzburg 1954

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. Dr. W. Neumann

Beiträge zur Kenntnis der Wirkung tierischer Gifte auf die Dehydrierung von Bernsteinsäure im Rinderhirnhomogenat

INAUGURAL-DISSERTATION

verfaßt und der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

der

JULIUS MAXIMILIANS - UNIVERSITÄT WÜRZBURG

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Siegfried Seifert

aus Eisfeld

Würzburg 1954

REFERENT: Professor Dr. Dr. W. N e u m a n n

Tag der mündl. Prüfung:

17. Dez. 1954

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg

Herrn Burkhard Held in Freundschaft

Inhaltsübersicht.

	Seite:
Einleitung	2
Methodik	3
I. Verwendete Substanzen	3
II. Verwendete Apparaturen	4
III. Versuchsausführung	4
Eigene Untersuchungen	9
I. Einfluss äusserer Umstände auf die Fermentaktivität bei der Dehydrierung von Bernsteinsäure.	9
II. Bienengiftwirkung auf die Dehydrierung von Bernsteinsäure.	11
III. Die Wirkung verschiedener Schlangengifte auf die Dehydrierung von Bernsteinsäure.	16
Besprechung	17
Zusammenfassung	21
Tabellenanhang	22
Literaturverzeichnis	31

Nach Beobachtungen von F L E C K E N S T E I N und Mit - arbeitern können "Bienengift und Schlangengifte die Dehydrierungsprozesse im Froschmuskelbrei noch in ausserordentlich hohen, teilweise millionenfachen Verdünnungen spezifisch hemmen." Bienengift in einer Konzentration von 1 : 1o ooo bewirkt bei der von diesen Autoren benutzten Versuchsmethodik bei der Dehydrierung von Zitronensäure eine totale, bei der Dehydrierung von Bernsteinsäure eine nahezu totale Hemmung.

Untersuchungen am hiesigen Pharmakologischen Institut mit Rinderhirn als Fermentpräparat und Methylenblau, später Triphenyltetrazoliumchlorid (nach K U H N und Mitarb.) als Indikator und Bernsteinsäure als Substrat bestätigten den hemmenden Einfluss des Bienengiftes, Wespengiftes und verschiedener Schlangengifte auf die fermentative Wasserstoffübertragung, jedoch konnte eine 1oo %ige Hemmung nicht erreicht werden. (R U D Z K O, R Ö H L, H E T Z E R, B A U S B A C K, S C H O E T E N S A C K.)

T I M M E R M A N N verbesserte im Laufe dieser Arbeiten die Versuchsmethodik, indem er Rinderhirnhomogenate verschiedener Herstellung auf ihre Brauchbarkeit als Fermentpräparat prüfte. Es gelang ihm mit dem sogenannten Fermentpräparat II, einer Hirnsuspension, aus der die gröberen Teile abzentrifugiert waren, relativ einheitliche Ergebnisse zu erzielen.

Die Aufgabe unserer Arbeit sollte sein, zunächst die Methodik weiterhin zu verbessern. Es interessierte darüber hinaus, den Wirkungsverlauf bei Bienengift und verschiedenen Schlangengiften während gewisser Zeitabschnitte zu verfolgen. Schliesslich sollte versucht werden, ob sich die von F L E C K E N S T E I N für Froschmuskelpräparate beschriebene 1oo %ige Hemmung der Dehydrierungsprozesse auch bei unserer Versuchsmethodik mit Rinderhirn als Fermentpräparat erreichen lassen würde.

M e t h o d i k.

I. Verwendete Substanzen.

Der Versuchsansatz enthielt folgende Reaktionsteilnehmer:

1. Fermentpräparat.

Im wesentlichen hielten wir uns an das von T I M M E R - M A N N beschriebene Verfahren zur Herstellung des sogenannten Fermentpräparates II. Schlachtfrisches Rindergrosshirn wurde von Blutkoagula und Häuten befreit, unter fliessendem Wasser kurz gewaschen und, mit 1 1/2 Gewichtsteilen Puffer versetzt, unter stets gleichen Bedingungen + homogenisiert. Das Homogenisat wurde 4o Minuten lang bei 2ooo U/min zentrifugiert. Das vom Bodensatz Überstehende verwendeten wir als Fermentpräparat.

T I M M E R M A N N hatte festgestellt, dass durch den Homogenisierungsgrad der Hirnsuspension die Höhe des Trockengewichtes und die Aktivität des Präparates massgeblich beeinflusst werden. Er hat die bei untersohiedlichen Trockengewichten ermittelten Formazanwerte, um vergleichbare Bedingungen zu erhalten, auf je 1 mg Trockensubstanz bezogen. Wir konnten die Extinktionen direkt miteinander vergleichen, da die Trockengewichte durch den konstant gehaltenen Homogenisierungsvorgang nur bis 1,2 % voneinander abwichen.

2. Puffer.

Der mit dem Jonometer bei 18° C auf pH 7,55 eingestellte Puffer war von G R E E N S T E I N angegeben worden:

o,2o g $CaCl_2$	o,2o g $MgSO_4$
6,8o g NaCl	2,2o g $NaHCO_3$
o,4o g KCl	o,125g NaH_2PO_4

auf looo ccm aqua destillata.

Wenn nicht besonders vermerkt, wurden unsere Versuche mit diesem Puffer ausgeführt.

+ Gleiche, mit Messbecher gemessene Füllung des Homogenisierglases; Homogenisation 1 Minute bei niedriger, 1 1/2 Minuten bei mittlerer Umdrehungsgeschwindigkeit; Tourenzahl des Motors durch Einstellen des Regulierwiderstandes auf angebrachte Marken so weit als möglich gleichmässig gehalten.

3. Substrat.
Als Substrat verwendeten wir 1 %ige Bernsteinsäure, die durch Zugabe von n-NaOH auf pH 7,55 gebracht worden war.

4. Indikator.
2,3,5 - Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC Bayer) in einer Konzentration von 2 % in Wasser.

5. Gifte.
Bienen- bzw. Schlangentrockengifte wurden in Puffer gelöst. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Endverdünnung im Ansatz.

6. Versuchsansatz.
Der Ansatz enthielt:

1 ccm Fermentpräparat,	o,5 ccm TTC - Lösung,
2 ccm Puffer,	o,5 ccm Giftlösung.
1 ccm Bernsteinsäurelösung,	

In den giftfreien Kontrollen erhöhte sich die Puffermenge auf 2,5 ccm.

7. Die Lösungen wurden bei +1° C aufbewahrt, das Fermentpräparat bei -6°C. Giftlösungen setzten wir für jeden Versuch frisch an.

II. Verwendete Apparaturen.

1. Homogenisator (Fa. Bühler, Tübingen).
2. Vakuumpumpe (Leybold - Chemikerpumpe) mit Manometer. Als Sicherung für die Pumpe waren zwei Waschflaschen und ein mit KOH gefüllter Turm eingeschaltet worden.
3. Wasserthermostat mit Relaisschaltung.
4. Schüttelmaschine.
5. Zentrifuge.
6. Pulfrich - Photometer der Fa. Zeiss/Jena.

III. Versuchsausführung.

Im Verlaufe unserer Untersuchungen bildeten sich 5 Anordnungen heraus, welche die Wirkung einer gleichen Giftkonzentration auf die Dehydrierung von Bernsteinsäure unterschiedlich beeinflussen.

1. Versuchsausführung A.
Wir hielten uns hierbei an die von N E T Z E R angegebene Methodik. In Thunbergröhrchen wurden 2 ccm Puffer, 1 ccm Bernsteinsäure und 1 ccm Fermentpräparat, in kleine Reagenzgläser o,5 ccm TTC und o,5 ccm Giftlösung pipettiert. Die kleinen Reagenzgläser stellten wir in die Thunbergröhrchen, die luftdicht verschlossen, nach Kühlung evakuiert und in einen bei 37° C gehaltenen Thermostaten eingebracht wurden. Nach einer Vorwärmdauer von 3 Minuten kippten wir den Inhalt der kleinen Reagenzgläser dem übrigen Versuchsansatz zu. (Versuchsbeginn; Zeit 0)

2. Versuchsausführung B.(1 h Vorvergiftung unter Luftabschluss)
In kleine Reagenzgläser wurden o,5 ccm TTC, in gekühlte Thunbergröhrchen 2 ccm Puffer, 1 ccm Bernsteinsäure und 1 ccm Fermentpräparat pipettiert. Kurz vor der Überführung der kleinen Reagenzgläser in die Röhrchen gaben wir dem Ansatz o,5 ccm Giftlösung, bzw. die gleiche Menge Puffer den giftfreien Kontrollen zu. Die Thunbergröhrchen wurden schnell verschlossen, evakuiert und in einen Thermostaten von 37° C gestellt. Nach Verlauf einer Stunde kippten wir den Inhalt der kleinen Reagenzgläser (o,5 ccm TTC) dem Versuchsansatz zu.(Zeit 0)
Bei dieser Methode wirkt das Gift zunächst 6o Minuten lang auf die Dehydrierung von Bernsteinsäure ein, bevor durch Teilnahme des TTC an der Reaktion Formazanbildung einsetzen kann. Die Methode wurde von N E T Z E R angegeben.

3. Versuchsausführung C.
Die Lösungen des gesamten Versuchsansatzes wurden in die gekühlten Thunbergröhrchen pipettiert, die wir nach luftdichtem Verschluss und Evakuieren in einen Thermostaten von 37° C überführten.(Zeit 0) Bei Beurteilung der Befunde aus dieser Methode ist zu berücksichtigen, dass sich vor Versuchsbeginn etwa 1/2 Stunde lang Giftlösung, Fermentpräparat und TTC in den bei 0° C gehaltenen Thunbergröhrchen befanden. Formazanbildung setzt erst während des Temperaturangleichs des Thunbergröhrcheninhaltes an die Thermostatenwärme ein. Kontrollröhrchen, die 4 Stunden lang in Eiswasser belassen wurden, zeigten keine Formazanbildung.
4. Versuchsausführung D.(2 h Vorvergiftung unter Luftzutritt)
2 Teile Puffer, 2 Teile Fermentpräparat und 1 Teil Giftlösung in Reagenzgläsern, bzw. als Kontrollen 3 Teile Puffer und 2 Teile

Fermentpräparat wurden 2 Stunden lang in einem Thermostaten von 37° C inkubiert. 2,5 ccm dieser Ansätze pipettierten wir in gekühlte Thunbergröhrchen, in die schon 1 ccm Puffer, 1 ccm Bernsteinsäure und o,5 ccm TTC eingebracht waren. Nach Verschliessen und Evakuieren wurden die Röhrchen in den Thermostaten überführt. (Zeit 0) Während der Vorvergiftung ist das Fermentpräparat ebenso wie in der Versuchsausführung 3 der doppelten Giftkonzentration ausgesetzt.

5. Versuchsausführung 3.
(2 h Vorvergiftung bei 37° C unter Luftzutritt und 3 Minuten Vorwärmdauer)
2 Teile Puffer, 2 Teile Fermentpräparat und 1 Teil Giftlösung in Reagenzgläsern, bzw. als Kontrollen 3 Teile Puffer und 2 Teile Fermentpräparat, wurden 2 Stunden lang in einem Thermostaten von 37° C inkubiert. 2,5 ccm dieser Ansätze pipettierten wir in gekühlte Thunbergröhrchen, in die schon 1 ccm Puffer und 1 ccm Bernsteinsäure eingebracht waren. o,5 ccm TTC in kleinen Reagenzgläsern gaben wir den Thunbergröhrchen zu, die nunmehr geschlossen und evakuiert wurden. Nach einer Vorwärmdauer von 3 Minuten in einem Thermostaten von 37° C kippten wir das TTC dem Gesamtansatz zu. (Zeit 0)

6. Das Evakuieren der Thunbergröhrchen.
Bei unseren einleitenden Versuchen, die nach der Technik von N E T Z E R und T I E M E R M A N N durchgeführt wurden, stellten wir fest, dass beim Evakuieren Teile des schäumenden Inhaltes (vermutlich Eiweissbestandteile) aus den Röhrchen abgesogen wurden. Um festzustellen, welchen Einfluss das Überschäumen von Röhrcheninhalt auf die Ergebnisse hat, liessen wir innerhalb eines Versuches aus einzelnen, besonders markierten Röhrchen grössere Mengen absaugen. Bei der Auswertung wichen die Extinktionen dieser Röhrchen von den übrigen ihrer Versuchsgruppe erheblich ab. Auch die Werte der nicht bezeichneten Röhrchen wiesen untereinander Differenzen auf, die wir nunmehr zu einem Teil auf diese Fehlerquelle zurückführen konnten. Zum anderen war wohl die Ursache in ungleichmässigem Evakuieren zu suchen. Die Röhrchen waren bisher ohne Beachtung eines einheitlichen Wärmegrades einzeln etwa 1 Minute lang evakuiert worden. Schon der durch die Temperaturdifferenz bedingte verschieden hohe Dampfdruck in den einzelnen Röhrchen verhinderte

eine gleichmässige Evakuation. Die Folge war, dass nach Ausgleich des O_2-Partialdruckes zwischen im Ansatz gelöstem und im übrigen Röhrchen noch vorhandenem Sauerstoff unterschiedliche Mengen dieses die Dehydrierung hemmenden Gases in den einzelnen Versuchsansätzen anwesend waren. Dieser Umstand war wohl in hohem Grade für die Differenzen der Werte innerhalb einer Gruppe verantwortlich.

Als Vorbedingung einer gleichmässigen Evakuierung führten wir eine intensivere Kühlung des Röhrcheninhaltes ein:
In einem äusseren Blechkasten wurde ein Gemisch von Eisstücken und Viehsalz so eingelegt, dass ein innerer Blechkasten allseitig von dieser Kältemischung umschlossen wurde. In den inneren Kasten hatten wir im Eisschrank vorgekühltes Wasser und Eisstücke eingefüllt. Unser Versuchsansatz in Thunbergröhrchen, die in ihren Ständern im Eiswasser des inneren Kastens bis zum Kolbenhals eintauchten, kühlte sich innerhalb von 4 Minuten auf 0° C ab.
Ein Verteiler gestattete die gleichzeitige und gleichmässige Evakuation von 6 Röhrchen. Konnte bisher bis zu 14 - 12 Torr evakuiert werden, so erreichten wir durch die Technik der Tiefkühlung nunmehr 4 Torr. Es wurde jeweils 5 Minuten lang (mit Stoppuhr gemessen) evakuiert. Die intensivere Kühlung gestattete, die Röhrchen während des Evakuierungsvorganges laufend durchzuschütteln, ohne dass ein Absaugen von Röhrcheninhalt beobachtet werden konnte.

7. Versuchsreihen.
Der Befund einer Versuchsreihe (Gruppe) stützt sich auf die Auswertung der Ergebnisse von 3 - 5 Einzelversuchen. Insgesamt wurden mehr als 2500 Einzelversuche ausgeführt.

8. Die Extraktion und Extinktion des Formazans.
Der Versuchsansatz wurde sofort nach Beendigung des Versuches einem mit 20 ccm Isopropanol und 1 ccm einer 2n-H_2SO_4 gefüllten Erlenmeyer-Kolben zugegeben. Die verschlossenen Kolben wurden 20 Minuten lang in der Maschine geschüttelt, und ihr Inhalt danach bei 3000 U/min zentrifugiert. Die klare, überstehende, rote Lösung wurde im Zeiss'schen Stufenphotometer bei Filter S 53 meist in einer 10 mm-Küvette gegen aqua dest. gemessen. Bei Verwendung von Küvetten anderer Schichtdicke wurden die Werte auf die 10 mm-Küvette umgerechnet.

Der Eigenreduktionswert des Fermentpräparates konnte unberücksichtigt bleiben, da Kontrollversuche ohne Zugabe von Bernsteinsäure zum Ansatz eine Extinktion von o,o2 ergaben.(Stundenwert)

9. Formazan - Eichkurve.

2,3,5 - Triphenyltetrazoliumchlorid (Bayer) wurde mehrmals dem Pharmazeutischen Institut der Universität Würzburg mit der Bitte übergeben, das TTC vollständig zu reduzieren. Die Eichkurven verliefen aber so unterschiedlich und unterschieden sich auch von der Eichkurve T I M M E R M A N N's, dass wir es vorzogen, unsere Ergebnisse nicht in γ Formazan, sondern in Extinktionswerten anzugeben.

lo. Bestimmung des Trockengewichtes.

Das Trockengewicht versuchten wir in ähnlicher Weise wie T I M M E R M A N N, zu bestimmen. Jeweils 3 abgewogene Uhrgläschen, je 1 ccm Fermentpräparat enthaltend, wurden 2 Stunden lang auf 12o° C erhitzt. Bei Befolgen der bisherigen Technik, die Trockenrückstände sofort nach der Entnahme aus dem Brutofen zu wiegen, stellten wir fest, dass sich durch ständige Aufnahme von Luftfeuchtigkeit das Gewicht der Substanz von Minute zu Minute so ändert, dass eine genaue Wägung und ein zuverlässiger Gewichtsvergleich von 3 Proben nicht erfolgen kann. Wir beobachteten aber, dass 6o Minuten nach Entnahme aus dem Brutofen ein einwandfreies Wägen möglich ist.

Um höhere Genauigkeit zu erreichen, hätten wir das Gewicht des Trockenrückstandes mit Hilfe eines Hygrometers zur Luftfeuchtigkeit in Beziehung bringen müssen. Wir verzichteten aber darauf, weil wir durch die Technik des gleichmässigen Homogenisierens auf ein nahezu konstantes Trockengewicht und auf die erforderlichen Vergleichsbedingungen der Ergebnisse gelangten. Aus diesen Gründen gingen wir davon ab, Formazan- oder Extinktionswerte auf je 1 mg Trockensubstanz zu beziehen.

Bei Angaben über Trockengewicht ist die in 1 ccm Hirnsuspension enthaltene Salzmenge mit 4,963 mg abgezogen. Das mittlere Trockengewicht in unseren Versuchen beträgt 39,8 mg.

Eigene Untersuchungen.

I. Einfluss äusserer Umstände auf die Fermentaktivität bei der Dehydrierung von Bernsteinsäure.

Mit unseren Versuchen verfolgten wir zunächst das Ziel, optimale Bedingungen für den Dehydrierungsvorgang zu prüfen. Wir liessen uns von der Überlegung leiten, dass gesteigerte Aktivität höhere Extinktionswerte bedingt und grössere Differenz zwischen Kontroll - und Hemmungswert zur Folge hat. Das bedeutet einmal eine Verbesserung der Genauigkeit der Ergebnisse und gestattet zum anderen eine Auswertung im günstigen Messbereich des Photometers.

1. Zunächst untersuchten wir den Einfluss der Pufferzusammensetzung auf die Aktivität der Dehydrierung von Bernsteinsäure. Wir variierten den von G R E E N S T E I N angegebenen Phosphat/Carbonatpuffer, den Phosphatpuffer nach S Ö R E N S E N und wandten Veronalpuffer und eine Glukoselösung an. Die als Puffer dienenden Lösungen (ausser Glukose) wurden mit dem Jonometer auf pH 7,55 eingestellt. (Tab. 1)

Zusammensetzung der Puffer:

I. Puffer nach GREENSTEIN (s. S. 3)
II. 2,2 g $NaHCO_3$; o,125 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$; 6,8 g NaCl
III. 2,2g $NaHCO_3$; o,125g $NaH_2PO_4.H_2O$; 6,8g NaCl; o,2g $CaCl_2$
IV. Puffer nach SÖRENSEN
V. Puffer nach SÖRENSEN und 4,6g NaCl; o,2g $CaCl_2$
VI. Puffer wie V. und o,4g KCl; o,2g $MgSO_4$
VII. Puffer wie VI. und 1,og $NaHCO_3$
VIII. Glukoselösung 1,88 mol.
IX. Glukoselösung 1,88 mol. in GREENSTEIN - Puffer
X. Veronalpuffer

Aus der Tab.1 geht hervor, dass unter sonst gleichen Bedingungen im Bicarbonat - Phosphatpuffer mehr als doppelt so viel Formazan gebildet wird, als im m/15 Phosphatpuffer und fast zehnmal mehr als im m/15 Veronalpuffer. GREENSTEIN- und SÖRENSENpuffer können durch Veränderung der Zusammensetzung in ihrer Wirkung nicht verbessert werden. Bei einem Vergleichsversuch mit Froschmuskelhomogenat als Fermentpräparat erwies sich der Puffer nach SÖRENSEN überlegen. Die Beobachtungen zeigen, dass die Puffersubstanzen bei der Untersuchung über die Fermentaktivität grosse Bedeutung erlangen.

2. Im folgenden sollte die Abhängigkeit der Formazanbildung vom

pH Wert des Puffers in Anlehnung an Befunde nach der Thunbergmethode von RÖHL in Versuchen mit TTC als Indikator beurteilt werden. (Tab. 2) Greensteinpuffer wurde mit dem Jonometer auf die pH Werte 6, 7 und 8 eingestellt.
Der Tabelle ist zu entnehmen, dass die Aktivität der Dehydrierung bei Steigerung der Alkalität des Milieus stark zunimmt. Dabei ist auffällig, dass der Unterschied zwischen der Formazanbildung bei pH 6 und derjenigen im Neutralpunkt besonders gross ist.
Bei Kontrollen der Pufferkapazität, die in diesem Zusammenhang durchgeführt wurden, stellte sich heraus, dass der Greensteinpuffer nur sehr geringes Pufferungsvermögen besitzt. So war z. B. bei den Versuchen mit dem Puffer von pH 8 der pH Wert des Gesamtansatzes 7,7 . Wenn man bedenkt, dass sogar die Fermentpräparate mit dem jeweils zum Versuch kommenden Puffer hergestellt waren, also nahezu 3,5 ccm Puffer im 5 ccm enthaltenden Ansatz vorhanden waren, so ist aus der obigen Beobachtung zu schliessen, dass der Ansatz gegen pH Wert - Verschiebungen äusserst empfindlich reagiert. Geringste Säurereste, die bei der Reinigung der Röhrchen nach ungenügendem Spülen zurückbleiben, können den Versuch unbrauchbar machen.

3. Die Aktivität der Dehydrierung wurde bei verschiedenen Temperaturen während der Formazanbildung untersucht. (Tab. 3)
Es zeigt sich, dass eine erhebliche Steigerung der Formazanbildung von 2o° C zu 3o° C erfolgt, dass aber die Zunahme der Formazanmenge von 3o° C nach 4o° C noch bedeutender ist. Bei 45° C wurde keine erhebliche Erhöhung der Extinktion mehr erreicht. Das Optimum der Versuchsbedingungen dürfte bei 4o° C liegen. Aus Gründen des Vergleichs zu früheren Arbeiten blieben wir bei unseren folgenden Versuchen bei einer Versuchstemperatur von 37° C und bei dem pH Wert 7,55 für den Puffer.

4. TIMMERMANN stellte eine "Aktivitätssteigerung der Bernsteinsäuredehydrase mit der Dauer des Homogenisierens" fest und schliesst daraus, dass "die Aktivität von Bernsteinsäure - Dehydrase - Präparaten aus Rinderhirn nicht an eine weitgehend intakte Zellstruktur gebunden ist, sondern sogar bei zunehmender Zerstörung der Zellstruktur gesteigert wird". Wir hatten eine Erhöhung der Formazanbildung bei Steigerung der Intensität des Homogenisierens ebenfalls festgestellt.

Bevor wir jedoch so weitreichende Schlüsse bestätigen wollten, untersuchten wir die Beziehungen zwischen Homogenisierdauer, Höhe des Trockengewichtes und der Formazanmenge.
Fermentzubereitungen in der Tab. 4
I wurden 2 Minuten niedertourig,
II wurden 1 Minute niedertourig und 1 Minute hochtourig,
III wurden 1 Minute niedertourig und 3 Minuten hochtourig homogenisiert. Als Trockengewichte wurden ermittelt für:
I 37,o mg II 46,o mg III 54,3 mg .
Aus der Tab. 4 geht hervor, dass sowohl die Höhe der Formazanbildung als auch die des Trockengewichtes von der Intensität des Homogenisierens abhängen. Es ist auffällig, dass die Menge der Trockensubstanz nicht in linearer Beziehung zur Formazanbildung steht. So ergeben Präparate mit 37,o mg Trockengewicht pro ccm einen Extinktionswert von o,19 und 46,o mg/ccm nicht etwa einen um 1/4 gesteigerten, sondern den 5 fachen Ablesewert. Ausgehend vom Trockengewicht II erzielt das der Gruppe III nicht eine um 1/6 , sondern eine um 1/3 erhöhte Extinktion. Dies scheint darauf hinzudeuten, dass es bei der Aktivität der Dehydrierung von Bernsteinsäure nicht nur auf die Menge der Fermentsubstanz im Versuchsansatz, sondern besonders auf die für die Reaktion zur Verfügung stehende Oberfläche ankommt. Der Versuch weist eindringlich nach, von welch ausschlaggebender Bedeutung der von uns eingeführte einheitliche Homogenisierungsvorgang für die Vergleichsmöglichkeit verschiedener Versuche ist. Es scheint der Schluss berechtigt, dass nur Versuche mit gleichem Trockengewicht miteinander in Beziehung gebracht werden können.

II. Bienengiftwirkung auf die Dehydrierung von Bernsteinsäure.

1. Zunächst untersuchten wir unzerlegtes Trockengift 51 und zogen die in den Jahren 1948 und 195o hergestelltes Pikratgifte des Pharmakologischen Institutes der Universität Würzburg zum Vergleich heran. Dann prüften wir auch die auf elektrophoretischem Wege gewonnenen Fraktionen I und II+ des Bienengiftes.

+ Verdünnungsreihen der Fraktionen I und II wurden uns freundlicherweise von Herrn Dr. Habermann zur Verfügung gestellt.

Die Wirkung der zu verschiedener Zeit hergestellten Trockengifte stimmt vollkommen überein und hemmt die Dehydrierung von Bernsteinsäure in der angegebenen Konzentration im Verlauf von 12o Minuten um 36 %. Die beiden Fraktionen des Bienengiftes nehmen dagegen auf die Dehydrierung sehr verschieden Einfluss. Die Fraktion I behindert in der Konzentration von o,5 γ/ccm die Formazanbildung überhaupt nicht, in der Konzentration von 2 γ/ccm nur gering. Der die Dehydrierung hemmende Einfluss des Bienengiftes ist fast ausschliesslich in der Fraktion II enthalten. Aus dem Verlauf der Werte der Fraktion II und dem des Bienengiftes ist zu ersehen, dass bei gleicher Verdünnung der hemmende Effekt der Fraktion II grösser ist, da in ihr der die Dehydrierung beeinflussende Faktor durch Abspaltung der Fraktion I angereichert wurde.

2. Die Bienengiftwirkung auf die Dehydrierung von Bernsteinsäure durch Rinderhirn in verschiedenen Puffern.
Die Tab. 6 veranschaulicht, dass der hemmende Einfluss des Bienengiftes auf die Dehydrierung im Greensteinpuffer grösser ist, als im Phosphatpuffer nach SÖRENSEN.

3. Wir untersuchten die Bienengiftwirkung auf die Dehydrierung bei verschiedenen pH Werten des Greensteinpuffers. Aus der Tab. 7 geht hervor, dass die Bienengiftwirkung im Milieu von pH 8 grösser ist.

4. Bienengift in der Konzentration 1:5oo wurde in verschiedenem Milieu 3o Minuten lang auf 98° C erhitzt, in Puffer von pH 7,55 weiterverdünnt und mit einer Verdünnungsreihe aus nicht erhitztem Gift zum Vergleich gebracht. Die Tab. 8 zeigt, dass erhitztes Bienengift einen Teil seiner Wirkung auf die Dehydrierung eingebüsst hat. Dabei leidet das bei pH 5 erhitzte Gift relativ wenig, ein besonderer Wirkungsabfall ist aber mit dem Überschreiten des Neutralpunktes zu erkennen.

5. Die Bienengiftwirkung auf die Dehydrierung von Bernsteinsäure bei verschiedenen Temperaturen ist aus Tab. 9 zu ersehen. Wir wählten als Versuchstemperaturen 3o° C und 4o° C, da wir festgestellt hatten, dass der Unterschied in der Formazanbildung zwischen diesen Temperaturen besonders gross ist. (s. S. 1o, 3.) Aus der Tab. 9 ist zu entnehmen, dass der hemmende Einfluss des Giftes auf die Dehydrierung bei einer Versuchstemperatur von 4o° C wesentlich höher ist, als bei 3o° C.

6. Wir untersuchten den Einfluss des Bienengiftes auf die Dehydrierung von Bernsteinsäure durch Fermentpräparate verschiedener Trockengewichte. Die Tab. 1o veranschaulicht die Abnahme der Bienengiftwirkung in den Versuchen mit höherem Trockengewicht.

7. Bisher hatten wir den Einfluss des Bienengiftes auf die Dehydrierung von Bernsteinsäure nach einer bestimmten Versuchsdauer ausgewertet. Es interessierte nun die Wirkung des Giftes während des Versuches, d. h. die Frage, ob diese Wirkung während der ganzen Versuchsdauer gleichmässig verläuft und ob sie bei Änderung der Versuchstechnik beeinflusst wird. Die ausgeführten Versuchsanordnungen A bis E sind auf den Seiten 5 und 6 beschrieben. Die Tab. 11 gibt die Messergebnisse dieser Versuche wieder. In der Tab. 12 wurde die bei obigem Versuch erfolgte Formazanbildung in den einzelnen Messabschnitten ausgewertet. In der Tab. 13 ist die Formazanmenge der einzelnen Messabschnitte auf den Stundenwert bezogen(QFt). Die Formazanbildung nach Beendigung der ersten 2o Minuten wurde mit 3, die des 2. Messabschnittes mit 1,5 multipliziert. In der Tab. 14 ist der hemmende Einfluss des Bienengiftes auf die Dehydrierung von Bernsteinsäure durch Rinderhirn aufgezeigt. Die Formazanbildung der Kontrollen (s. Tab. 11) ist als 1oo % angenommen. Die Versuche der Tabelle 11 wurden gleichzeitig durchgeführt und können ohne weiteres miteinander verglichen werden. Bei der Betrachtung der Kontrollen fällt auf, dass die höchsten Formazanwerte in den Versuchsausführungen A und B erreicht werden. Der Formazanwert 6o Minuten in der Versuchsanordnung C liegt zwar demgegenüber etwas zurück, jedoch ist der Unterschied in der 2o Minuten-Zeit erheblich grösser. Wie die Tab. 12 zeigt, ist sogar die Formazanbildung im zweiten Messabschnitt höher als in den Versuchsausführungen A und B. Das berechtigt den Schluss, dass die Aktivität des Fermentes durch längere Abkühlung auf 0° C nicht geschwächt wird. Die Formazanwerte der Kontrollen in den Versuchsanordnungen D und E verhalten sich etwa gleich. Bei der Versuchsausführung E liegen sie wohl nur deshalb höher, weil mit einer 3 minütigen Vorwärmdauer gearbeitet wurde. Gegenüber den anderen Versuchsausführungen sind jedoch die Extinktionen der Kontrollen erheblich geringer. Wie noch aus anderen Versuchen hervorgeht, dürfte dies auf einer Wärmeschädigung des Fermentpräparates beruhen.

Die Formazanbildung in Anwesenheit von Bienengift lässt erkennen, dass in der Versuchsanordnung A die anfangs geringe Giftwirkung mit der Versuchsdauer zunimmt. Bei den übrigen Anordnungen, in denen das Ferment vorvergiftet wurde, ist das umgekehrt, mit der Versuchsdauer nimmt die Bienengiftwirkung ab. Eine längere Inkubation, wie z. B. die in Anordnung D und E ausgeführte, erhöht die Bienengiftwirkung beträchtlich. Dabei ist auffällig, dass in der Anordnung D bei der 2o Minuten - Zeit die Formazanbildung t o t a l gehemmt ist.
Wenn man die Giftwirkung in allen Anordnungen vergleicht, so scheint sie nach einer Versuchsdauer von 6o Minuten einem gemeinsamen Bereich, der zwischen 45 % und 62 % Hemmung der Formazanbildung liegt, zuzustreben.

8. Es erhebt sich die Frage, wie die Formazanbildung jenseits der bisher verfolgten ersten Stunde anläuft. Es wurde dies zunächst in der Versuchsausführung A geprüft. (s. Tab. 15 a und b) Der Versuch wurde auf 4 Stunden ausgedehnt. Aus der Tab. 15 b ist zu entnehmen, dass die Formazanbildung der Kontrollen, wenn man gleiche Zeitabschnitte miteinander vergleicht, mit der Versuchsdauer gleichförmig abnimmt, die Formazanbildung in Anwesenheit von Bienengift in beiden Konzentrationen bis zum 6o Minutenwert stärker abnimmt als in den folgenden Stunden.
Die durchschnittliche hemmende Wirkung des Bienengiftes hat nach Ablauf von 2 Stunden einen Endwert erreicht; bis zum Versuchsende beträgt bei einer Giftkonzentration von 1 γ/ccm die Hemmung der Formazanbildung 45 %, bei loo γ/ccm 68 %. (Siehe Tab. 15c)

9. Mit den in Tab. 16a wiedergegebenen Versuchen prüften wir die Reaktionen, die sich in den ersten Versuchsminuten abspielten. Während die Formazanbildung in Anwesenheit von o,1 γ/ccm Bienengift bei den Messpunkten 5 Minuten und lo Minuten überhaupt nicht behindert wird, setzt in Anwesenheit von loo γ/ccm Bienengift die Formazanbildung verzögert ein. In der Versuchsreihe mit o,1 γ/ccm und 1 γ/ccm Gift steigert sich die hemmende Wirkung des Bienengiftes, bei loo γ/ccm fällt sie bis zum lo Minuten - Messpunkt stark ab, um dann wieder leicht anzusteigen. Die letztere Beobachtung veranlasste uns, einen weiteren Versuch in Anwesenheit von loo γ/ccm Bienengift bis zu einer Dauer von 9 Minuten durchzuführen. (S. Tab. 16b) Der obige Befund wurde

hierin bestätigt. Es zeigte sich darüber hinaus, dass die Formazanbildung bis zum Messpunkt 3 Minuten bei der Kontrolle verzögert einsetzt, in Anwesenheit von 1oo γ/ccm Gift unterbleibt.

1o. Der folgende Versuch wurde in Anordnung A und E in Anwesenheit von o,1 γ/ccm Bienengift auf 2 Stunden ausgedehnt, (siehe Tab. 17). Der Befund bei Anordnung A bestätigte den obigen Versuch, in dem sich die Wirkung von o,1 γ/ccm Gift mit der Versuchsdauer steigert. In der Anordnung E wird besonders deutlich, wie die Bienengiftwirkung durch vorherige Inkubation von Gift und Fermentpräparat gesteigert werden kann. Die durchschnittliche Hemmung des Dehydrierungsvorganges liegt nach Verlauf von 2 Stunden bei der Versuchsausführung A um 18 %, bei E um 46 %. Durch die Vorvergiftung wurde eine 2 1/2fache Steigerung der Giftwirkung erreicht.

11. Es sollte die Bienengiftwirkung nach Anordnung D (Gift und Ferment bei Luftzutritt inkubiert, TTC und Bernsteinsäure zugesetzt, Formazanbildung im Vakuum) und Anordnung E (wie Anordnung D mit dem Unterschied, dass das TTC erst nach Vorwärmung des Gesamtansatzes zugesetzt wurde) untersucht werden. (s. Tab. 18). Zunächst ist auffällig, dass die berechnete Formazanbildung der Kontrollen im Versuch mit 4 stündiger Inkubation nur um etwa 13 % tiefer liegt als bei 2 stündiger Vorvergiftung. Der Unterschied zwischen den Werten ohne Vorvergiftung und bei 2 stündiger Inkubation ist dagegen nach Tab. 11 etwa 3o %. Die Wärmeschädigung des Fermentes scheint bei 37° C nach Ablauf von 2 Stunden nicht mehr erheblich zuzunehmen. Die durchschnittliche Hemmung des Giftes bleibt in der Versuchsausführung D nach Ablauf einer Stunde bis zum Versuchsende nach 3 Stunden gleich hoch. (Vergleiche hierzu die gleichbleibende durchschnittliche Hemmung nach einer 2 stündigen Versuchsdauer bei der Anordnung A in der Tab. 15c). Aus dem Versuch ist weiter zu entnehmen, dass durch eine 4 stündige Inkubation die Giftwirkung nochmals um 2o % gesteigert wird.

12. Zur Prüfung eines Einflusses des wärmebedingten Aktivitätsverlustes des Fermentpräparates wurde nach Anordnung C eine Versuchsreihe ohne und mit 2 stündiger Vorvergiftung durchgeführt. Gleichzeitig prüften wir eine Versuchsgruppe, in der das Fermentpräparat 2 Stunden lang bei 37° C im Thermostaten belassen war, bevor es nach Anordnung C zum Versuch kam,

Aus dem Befund (s. Tab. 19) geht hervor, dass Bienengift den Dehydrierungsvorgang bei einem durch Wärme geschädigten Fermentpräparat prozentual im gleichen Ausmass schädigt wie bei einem frischen Fermentpräparat ohne Vorvergiftung. Die Steigerung der Wirkung des Bienengiftes durch Inkubation scheint demnach auf der längeren Einwirkung des Giftes auf das Fermentpräparat zu beruhen und nicht auf einem wärmebedingten Aktivitätsverlust des Fermentpräparates. In diesem Versuch wird besonders deutlich, dass hohe Giftverdünnungen durch Inkubation in ihrer Wirkung am meisten gesteigert werden.

III. Die Wirkung verschiedener Schlangengifte auf die Dehydrierung von Bernsteinsäure.

Es sollte geprüft werden, in welchem Masse einige Schlangengifte die Dehydrierung von Bernsteinsäure beeinflussen; sie standen als Trockengifte zur Verfügung.

1. Eine Verdünnungsreihe mit Gift der Naja naja in Konzentrationen von o,oo2 γ/ccm bis 2o γ/ccm (s. Tab. 2o) überraschte insofern, als die Konzentration 1:5o Mill. die Formazanbildung nach 2 stündiger Versuchsdauer noch deutlich zu hemmen vermag. Das Kobra - Gift erwies sich also als ausserordentlich wirksam hinsichtlich der Hemmung der Dehydrierung von Bernsteinsäure. Der Versuch war nach Anordnung A ausgeführt.

2. Es interessierte weiter, ob auch bei Schlangengiften die Giftwirkung durch Inkubation noch gesteigert werden kann. Der in Tab. 21 wiedergegebene Versuch wurde nach Anordnung A und E mit 1 γ/ccm Naja naja - Gift ausgeführt. Die Befunde liegen völlig analog wie beim Bienengift. (s. Tab. 11 bis 17).

3. Naja flava - Gift wurde in der Konzentration 1 γ/ccm nach Anordnung A und E untersucht. (s. Tab. 22). In der Versuchsausführung A konnte nach 1 Stunde keine Giftwirkung und nach 2 Stunden nur ein die Formazanbildung um 8 % hemmender Effekt festgestellt werden. Im Gegensatz hierzu zeigte sich nach 2 stündiger Vorvergiftung beim Messpunkt 12o Minuten ein Hemmungserfolg von 28 %. Das ist eine rund 3 fache Wirkungssteigerung durch die Inkubation. Die Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die Wirkung eines auf die Dehydrierung von Bernsteinsäure nach Anordnung A gering wirkenden Giftes durch Inkubation auf das Mehrfache gesteigert werden kann. Dagegen nehmen Gifte, die nach Ausführung A schon in grossen Verdünnungen hochwirksam sind,

oder in starken Konzentrationen einen erheblichen Hemmungseffekt haben, in ihrem hemmenden Einfluss bei Inkubation nicht mehr erheblich zu.

4. Das oben Gesagte wurde im Versuch mit Lachesis muta - Gift bestätigt. (s. Tab. 23)

5. Noch geringer vermag das Gift der Bothrops yararaca auf die Dehydrierung von Bernsteinsäure in der Versuchsausführung A einzuwirken. Nach 2 stündiger Inkubation beträgt die Wirkungszunahme das 4 1/2 fache. (s. Tab. 24)

6. Es sollte das Gift der Bothrops neuwiedii nach Anordnung A und E untersucht werden. (s. Tab. 25)

7. Es wurde das Gift der Vipera berus nach Versuchsausführung A und E geprüft. (s. Tab. 26) Es war wirksamer als die Gifte der Naja flava, Lachesis muta, Bothrops yararaca und Bothrops neuwiedii.

8. Die Wirkung des Giftes von Crotalus terrificus nach Anordnung A gibt die Tab. 27 wieder.

9. Um einen direkten Vergleich der Wirkung einiger Schlangengifte mit der von Bienengift zu erhalten, wurden Gifte von Naja naja, Naja tripudians, Naja flava gleichzeitig mit Bienengift in einem Versuch nach Anordnung C geprüft. (s. Tab. 28) Hierbei stellte sich heraus, dass die Wirkung des Giftes der Naja naja erheblich über der von Bienengift liegt.

B e s p r e c h u n g.

Unsere Versuche hatten in ihrem ersten Teil das Ziel, die Einzelheiten der Versuchsmethodik zu überprüfen.
Zunächst erschien uns die bisher geübte Beziehung der Formazanwerte auf das Trockengewicht umständlich und trotzdem nicht ganz zuverlässig zu sein. Wir versuchten, die lästige Umrechnung auszuschliessen und allen unseren Versuchen ein einheitliches Trockengewicht zugrunde zu legen. Dies gelang durch Homogenisieren der Hirnsuspension unter konstanten äusseren Bedingungen. Dabei konnten wir nachweisen, dass Trockengewicht und Formazanbildung des Fermentpräparates nicht in linearer Abhängigkeit stehen, eine direkte Beziehung der gewonnenen Formazanmenge auf die Trocken-

substanz also sogar Fehler in sich birgt.

Zur Erzielung gleichmässiger Ergebnisse strebten wir ausserdem eine intensivere Kühlung und Evakuierung an. Ausgehend von der Überlegung, dass unterschiedliche Sauerstoffreste in den Thunbergröhrchen die Formazanbildung ganz wesentlich verschieden beeinflussen, führten wir ein Kühlsystem ein, bei dem nicht mehr die einzelnen Röhrchen für sich, sondern alle Thunbergröhrchen des Versuches gleichzeitig abgekühlt wurden, sodass wir damit einen allgemein gleichen O_2 - Partialdruck erreichten. Durch die Anwendung einer Kältemischung konnten wir darüber hinaus höher und gefahrloser evakuieren; auf diese Weise wurde der die Dehydrierung hemmende Sauerstoff zuverlässiger entfernt.

Bei den Versuchen mit verschiedenen Pufferzusammensetzungen erwies sich der GREENSTEIN - Puffer allen anderen überlegen; in ihm entwickelt sich die höchste Aktivität des Fermentpräparates. Gleichzeitig stellte sich aber heraus, dass die Pufferkapazität nur gering ist.

Die Überprüfung der Aktivität des Fermentpräparates bei verschiedenen Versuchstemperaturen berechtigte zur Beibehaltung einer Temperatur von 37° C. Wenn auch bei etwas höheren Temperaturen die Formazanausbeute zunimmt, so kommt man bei weiterer Temperatursteigerung bald dem Eiweissgerinnungspunkt gefährlich nahe.

Die Hemmung der Dehydrierung von Bernsteinsäure durch Bienengift ist fast ausschliesslich auf die Fraktion II des nach NEUMANN, HABERMANN und AMEND auf elektrophoretischem Wege zerlegten Bienengiftes beschränkt. Wenn auch die Konzentration 1:5oo ooo der Fraktion I einen geringen hemmenden Einfluss ausübte, so ist daran zu denken, dass dies durch Verunreinigung dieser Fraktion mit geringen Mengen der stark wirksamen Fraktion II begründet sein kann.

Bei Untersuchungen der Giftwirkung in verschiedenen Puffern entfaltete in GREENSTEIN - Puffer, in dem auch das Fermentpräparat die höchste Aktivität zeigte, das Gift seine stärkste hemmende Wirkung. Analog hierzu verlief der Versuch mit Puffern von verschiedenen pH - Werten. Bei pH 8 wurde die grösste Aktivität und zugleich die höchste Giftwirkung beobachtet.

Umgekehrt zeigte das in saurem Milieu (pH 5) auf 98° C erwärmte Gift die geringste Einbusse seiner hemmenden Eigenschaft im Vergleich zu analogen Lösungen, die in weniger sauren oder in alkalischem Milieu auf gleiche Temperatur erhitzt waren.

In früheren Untersuchungen schien die Giftwirkung mit der Versuchsdauer einerseits zuzunehmen (METZER), andererseits dagegen abzusinken (BAUSBACK). Wir konnten durch 5 Varianten der Versuchsausführung klären, dass die im Verlaufe des Versuches scheinbare Zu- oder Abnahme des hemmenden Effektes durch die Methodik bewirkt wird.

Nach SCHOETTBACH ist in Rinderhirnpräparaten eine totale Hemmung der Formazanbildung durch Bienengift nicht zu erreichen, während nach FLECKENSTEIN in Froschmuskelpräparaten bei bestimmten Giftkonzentrationen eine totale Hemmung möglich ist. Nach unseren Versuchen hängt aber das Ausmass der Hemmung nicht so sehr von der Bienengiftkonzentration, als vielmehr von anderen Einzelheiten der Versuchsmethodik und von der Versuchsdauer ab.

Nach unseren Erfahrungen eignet sich von den weiter oben beschriebenen einzelnen Versuchsausführungen die Anordnung C (alle Lösungen des Versuchsansatzes zusammen in die gekühlten Thunbergröhrchen eingebracht) wegen ihrer einfachen Handhabung besonders gut für vergleichende Reihenuntersuchungen.

Im übrigen zeigen die Tab. 11 bis 14, dass sich nach Ablauf einer Stunde ein gewisses Gleichgewicht zwischen der Formazanbildung der Kontrollen und derjenigen in Anwesenheit von Gift herauszubilden beginnt, wobei sich die Wirkung von 1 γ/ccm Bienengift in allen Versuchsausführungen einer zwischen 45 % und 62 % liegenden Hemmung nähert.

Weiterhin stellte sich heraus, dass der Einfluss von gering wirksamen Giften oder auch von hohen Verdünnungen an sich stark wirksamer Gifte durch Inkubation bedeutend mehr gesteigert werden kann, als es bei von vornherein hochwirksamen Giften oder bei hoher Konzentration schwächerer Gifte der Fall ist. Wenn durch Inkubation die Giftwirkung gesteigert wird, so ist dies nicht auf eine temperaturbedingte Schädigung der Aktivität des Fermentpräparates zurückzuführen.

Ein verschiedenes Verhalten von stärkeren und schwächeren Lösungen eines Giftes zeigte sich ausserdem bei der Versuchsaus-

führung A. Während in Anwesenheit von 1oo γ/ccm Bienengift die Formazanbildung bis zum 3 Minuten - Wert unterbleibt und dann verzögert einsetzt, vermag die Konzentration o,1 γ/ccm die Formazanbildung bis zu einer Versuchsdauer von 15 Minuten überhaupt nicht erkennbar zu hemmen.

Von den untersuchten Schlangengiften erwies sich das der Naja naja in seinem Einfluss auf die Dehydrierung als den übrigen und dem Bienengift überlegen. Auch bei den in Anordnung A wenig wirksamen Giften, wie z. B. denen der Naja flava, Lachesis muta und Bothrops yararaca, konnte der Effekt durch Inkubation in gleicher Weise wie bei hohen Bienengiftverdünnungen bedeutend gesteigert werden. Insgesamt entsprachen die Schlangengifte in ihrer Einwirkung auf den Dehydrierungsvorgang dem Bienengift.

Die Ergebnisse unserer Arbeit stimmten im grossen und ganzen mit den Befunden von FLECKENSTEIN überein. Geringe Differenzen finden ihre Erklärung wohl darin, dass eine bedeutend grössere Aktivität unserer Fermentpräparate eine exakte Beobachtung des Dehydrierungsvorganges bereits bei Versuchszeiten von 3 Minuten ab gestattet. Es konnte infolgedessen nicht nur ein Vergleich verschiedener Giftkonzentrationen und verschiedener Gifte untereinander durchgeführt werden, sondern auch der Verlauf der Wirkung eines bestimmten Giftes über eine längere Versuchsdauer hin verfolgt werden.

FLECKENSTEIN beachtete bei seinen Untersuchungen den entscheidenden Einfluss des Zeitfaktors auf die beobachtete Giftwirkung nicht; er beendete seine Versuche, "wenn in den giftfreien Kontrollen mit Substrat nach ein bis drei Stunden eine stärkere Rotfärbung durch das ... Triphenylformazan eingetreten war." Unsere Versuche zeigen jedoch, dass sich die Wirkung eines bestimmten Giftes auf die Formazanbildung mit der Zeit ändert, sodass also Versuche, in denen die Versuchsdauer oder das Trockengewicht des Fermentpräparates differieren, nicht zuverlässig untereinander verglichen werden können.

Zusammenfassung.

Die hier vorliegenden, mit der sogenannten TTC - Methode ausgeführten Untersuchungen über die Dehydrierung von Bernsteinsäure durch ein Rinderhirnpräparat verbesserten zunächst die Versuchstechnik. Durch Beibehaltung eines bestimmten Homogenisierungsvorganges liess sich ein relativ einheitliches Trockengewicht erreichen, sodass ein besserer Vergleich der Befunde möglich wurde. Gleichzeitig konnten durch bessere Kühlung die Thunbergröhrchen gleichmässiger und höher evakuiert werden; durch die weitgehende Ausschaltung des Luftsauerstoffes liess sich auch die Aktivität des Fermentpräparates steigern.

Die Wirkung von Bienengift auf den Dehydrierungsvorgang kann durch Variierung der Versuchsmethodik weitgehend verändert werden. Divergierende Befunde früherer Arbeiten finden hierin ihre Aufklärung. Das in den einzelnen Versuchsausführungen anfangs sehr verschiedene Verhältnis zwischen der Formazanbildung der gifthaltigen Ansätze und der Kontrollen stellt sich nach etwa 2 Stunden auf ein Gleichgewicht ein und strebt dabei einem einheitlichen Bereich zu. Die Annäherung von einerseits 22 %, andererseits loo % Hemmung der Kontroll - Formazanbildung auf Werte, die zwischen 45 % und 62 % liegen, erfolgte bei einer Bienengiftkonzentration von 1:1 Mill. innerhalb einer Stunde.

In der Literatur niedergelegte Befunde (FLECKENSTEIN) über eine nahezu loo %ige Hemmung der Bernsteinsäure - Dehydrierung durch Bienengift im Froschmuskelpräparat wurden von uns bei Rinderhirnpräparaten prinzipiell bestätigt, waren aber an eine bestimmte Versuchsanordnung und eine beschränkte Versuchsdauer gebunden.

Auf den Dehydrierungsvorgang bei akutem Zusatz nur wenig wirkendes Gift kann ebenso wie hohe Verdünnungen eines wirksamen Giftes in seinem Effekt wesentlich gesteigert werden, wenn das Fermentpräparat zunächst mit dem Gift inkubiert wird.

Giftkonzentrationen, die bei akutem Zusatz schon hochwirksam sind, erfahren dagegen bei der sogenannten Vorvergiftung, d. h. bei ihrer Einwirkung auf ein substratfreies Fermentpräparat, nur eine geringe Steigerung ihres hemmenden Einflusses auf die Formazanbildung.

Die untersuchten Schlangengifte verhalten sich dem Bienengift analog, wenn man die in mittleren Konzentrationen gering wirksamen Gifte (z. B. der Naja flava, Lachesis muta und Bothrops yararaca) mit hohen Bienengiftverdünnungen vergleicht. Das Gift der Naja naja übt unter allen untersuchten Giften den stärksten hemmenden Einfluss auf die Dehydrierung von Bernsteinsäure aus.

T a b e l l e n a n h a n g.

Tab. 1. Wirkung verschiedener Puffer auf die Formazanbildung. (Extinktionswerte)

Puffer +	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
6o min	o,67	o,56	o,54	o,29	o,25	o,22	o,21	o,o2	o,26	o,o6
12o min	1,o8	o,98	o,96	o,47	o,39	o,36	o,37	o,o5	o,43	o,13

+ vergl. S. 9.

Tab. 2. Abhängigkeit der Formazanbildung vom pH - Wert des Puffers. (Puffer nach GREENSTEIN, Extinktionswerte)

	pH 8	pH 7	pH 6
3o min	o,6o	o,39	
6o min	1,15	o,75	o,o8
12o min			o,16

Tab. 3. Beeinflussung der Formazanbildung durch die Versuchstemperatur. (Extinktionswerte)

Temperatur	2o° C	3o° C	4o° C	45 ° C
3o min	o,o6	o,22	o,5o	o,65
6o min	o,o8	o,38	1,oo	1,12
12o min	o,1o	o,65	1,8o	1,87

Tab. 4. Abhängigkeit der Formazanbildung von der Dauer des Homogenisierens. (Extinktionswerte)

Ferment +	I	II	III
6o min	o,18	1,oo	1,3o
12o min	o,33		

+ vergl. S. 11.

Tab. 5. Wirkung des Bienengiftes (BG), 48, 5o, 51, und seiner Fraktionen I(F I) und II(F II) auf die Formazanbildung.

	Extinktion		Hemmung in %
	6o min	12o min	12o min
Kontrolle	o,92	1,5o	
BG o,5γ/ccm	o,61	o,92	36
F II o,5γ/ccm	o,55	o,86	41,7
F II 2γ/ccm	o,46	o,79	48
F I o,5γ/ccm	o,92	1,5o	o
F I 2,oγ/ccm	o,87	1,4o	7

Tab. 6. Einfluss verschiedener Puffer auf die Bienengiftwirkung.

	Greensteinpuffer			Sörensenpuffer		
	Extinktion		Hemm.%	Extinktion		Hemm.%
Vers.min	6o min	12o min	12o min	6o min	12o min	12o min
Kontrolle	o,34	o,57		o,25	o,39	
BG 5γ/ccm	o,185	o,29	48	o,16	o,285	27

Tab. 7. Die Bienengiftwirkung auf die Formazanbildung in Puffern von verschiedenen pH - Werten.

	pH 8				pH 7			
	Extinktion		Hemmung %		Extinktion		Hemmung in %	
Vers. min.	3o	12o	3o	12o	3o	12o	3o	12o
Kontrolle	o,78	2,36			o,395	1,455		
BG 1ooγ/ccm	o,o9	o,38	88	83,9	o,o65	o,47	83,5	68
BG 1γ/ccm	o,34	1,24	56,5	47,5	o,215	o,88	45,5	39,5

Tab. 8. Wirkung von erhitztem und nicht erhitztem Bienengift auf die Dehydrierung von Bernsteinsäure. (Versuchsdauer:6o min, Kontrollextinktion: 1,25) vergl. S. 12.

Konzentrationen	o,1 γ	1 γ	1o γ	1ooγ/ccm
Nicht erh. Gift	o,8o	o,48	o,325	o,215
Bei pH 8 erh. Gift	1,12	o,94	o,61	
Bei pH 7 erh. Gift	1,oo	o,63	o,43	
Bei pH 6 erh. Gift	o,98	o,61	o,39	
Bei pH 5 erh. Gift	o,85	o,55	o,36	

Tab. 9. Bienengiftwirkung auf die Formazanbildung bei verschiedenen Versuchstemperaturen. (Extinktionswerte)

	40° C.		30° C.	
Vers. min	60	120	60	120
Kontrolle	0,98	1,78	0,33	0,63
BG 40γ/ccm	0,18	0,38	0,10	0,23

Tab. 10. Abhängigkeit der Bienengiftwirkung von der Zubereitungsart des Fermentpräparates. (Fermentpräparat I, II und III siehe S. 11)

		Extinktion		Hemmung in %	
Versuchsminuten		60	120	60	120
F I	Kontrolle	0,18	0,33		
	BG 100γ/ccm	0,015	0,035		89
F II	Kontrolle	1,00			
	BG 100γ/ccm	0,205		80	
F III	Kontrolle	1,30			
	BG 100γ/ccm	0,30		75	

Tab. 11. Einfluss verschiedener Versuchsanordnungen auf die Bienengiftwirkung. (Versuchsausführungen A bis E siehe S. 5 und 6, Werte in Extinktionen)

Vers.Ausf.	A		B		C		D		E	
Vers. min	20	60	20	60	20	60	20	60	20	60
Kontrolle	0,30	0,815	0,295	0,795	0,17	0,70	0,135	0,47	0,15	0,50
BG 1γ/ccm	0,23	0,47	0,135	0,40	0,07	0,38	0,00	0,15	0,04	0,17

Tab. 12. Formazanbildung in den Messabschnitten, (Extinktionen)

Vers.Ausf.	A		B		C		D		E	
Vers. min	20	60	20	60	20	60	20	60	20	60
Kontrolle	0,30	0,52	0,295	0,50	0,17	0,53	0,135	0,33	0,15	0,35
BG 1γ/ccm	0,23	0,24	0,135	0,265	0,07	0,31	0,00	0,15	0,04	0,13

Tab. 13. Die QFt - Werte der Formazanbildung des Versuches der Tab. 11. (Extinktionen)

Vers.Ausf.	A		B		C		D		E	
Vers. min	20	60	20	60	20	60	20	60	20	60
Kontrolle	0,90	0,69	0,885	0,66	0,51	0,71	0,405	0,44	0,45	0,47
BG 1γ/ccm	0,69	0,32	0,405	0,36	0,21	0,41	0,00	0,22	0,12	0,17

Tab. 14. Hemmung der Formazanbildung durch 1γ /ccm Bienengift. (Zu Tab. 11, H 1 = Durchschnitt der Hemmung in %, H 2 = Hemmung zwischen den Messabschnitten in %)

Vers.ausf.	A		B		C		D		E	
Vers. min	2o	6o	2o	6o	2o	6o	2o	6o	2o	6o
H 2	22	54	54	45	59	42	1oo	54	7o	62,5
H 1	22	43	54	49	59	46	1oo	66	7o	65

Tab. 15 a. Abhängigkeit der Bienengiftwirkung von der Versuchsdauer in der Anordnung A. (Extinktionen)

Vers. min	3o	6o	12o	24o
Kontrolle	o,34	o,66	1,18	1,94
BG 1oo γ/ccm	o,13	o,22	o,38	o,62
BG 1 γ/ccm	o,24	o,38	o,64	1,o5

Tab. 15 b. Formazanbildung in den Messabschnitten. (Die Werte 6o min bis 9o min und 12o min bis 15o min sind intrapoliert, Werte in Extinktionen)

Vers. min	o - 3o	3o - 6o	6o - 9o	6o-12o	12o-15o	12o-24o
Kontrolle	o,34	o,32	o,26	o,52	o,19	o,76
BG 1oo γ/ccm	o,13	o,o9	o,o8	o,16	o,o6	o,24
BG 1 γ/ccm	o,24	o,14	o,13	o,26	o,1o	o,41

Tab. 15 c. Hemmung der Formazanbildung in %.

	Bienengift 1oo γ/ccm				Bienengift 1 γ/ccm			
Versuchsminuten	3o	6o	12o	24o	3o	6o	12o	24o
Durchschnitt d.Hemm. bis zum Messpunkt	61	66	69	68	27,5	41	46	46
Hemmung zwischen den Messabschnitten	61	71	72	65	27,5	55	52	46

Tab. 16 a. Abhängigkeit der Bienengiftwirkung von der Versuchsdauer nach Anordnung A.

	Extinktion				Hemmung in %			
Versuchsminuten	5	1o	3o	6o	5	1o	3o	6o
Kontrolle	o,o8	o,17	o,49	o,9o				
BG 1oo γ/ccm	o,o2	o,o6	o,16	o,26	77	63	66	7o
BG 1 γ/ccm	o,o75	o,14	o,33	o,49	12	2o	33	45
BG o,1 γ/ccm	o,o8	o,17	o,46	o,74	o	o	6	18

Tab. 16 b. Bienengiftwirkung in Anordnung **A** bis zu einer Versuchsdauer von 9 Minuten.

	Extinktion			Hemmung in %		
Vers. min	3	6	9	3	6	9
Kontrolle	o,o35	o,18	o,3o			
BG 1ooγ/ccm	o,oo	o,o35	o,1o	1oo	8o	67

Tab. 17. Abhängigkeit der Bienengiftwirkung von der Versuchsdauer. (Anordnung A und E; H 1 = Durchschnitt der Hemmung in %, H 2 = Hemmung zwischen den Messabschnitten in %)

A n o r d n u n g A.						
	Extinktion		H 1		H 2	
Vers. min	2o	12o	2o	12o	2o	12o
Kontrolle	o,48	2,o2				
BG o,1γ/ccm	o,48	1,65	o	18	o	24
A n o r d n u n g E.						
	Extinktion		H 1		H 2	
Vers. min	2o	12o	2o	12o	2o	12o
Kontrolle	o,38	1,46				
BG o,1γ/ccm	o,16	o,8o	58	46	58	4o

Tab. 18. Abhängigkeit der Bienengiftwirkung von der Versuchsdauer. (Anordnung D und E[+]; D 1 = 2 stündige, D 2 = 4 stündige Vorvergiftung; H 1 = Durchschnitt der Hemmung in %, H 2 = Hemmung zw. den Messabschnitten in %)

A n o r d n u n g D 1									
	Extinktion			H 1			H 2		
Versuchsminuten	2o	6o	18o	2o	6o	18o	2o	6o	18o
Kontrolle	o,19	o,66	1,88						
B.-Gift 1γ/ccm	o,oo	o,27	o,78	1oo	59	59	1oo	41	59
A n o r d n u n g D 2									
	Extinktion			H 1			H 2		
Versuchsmin.	2o	12o		2o	12o		2o	12o	
Kontrolle	o,18	1,o5							
BG 1γ/ccm	o,oo	o,35		1oo	69		1oo	6o	

[+] Anordnung E : siehe S. 27.

Tab. 18. Fortsetzung (s. S. 26)

Anordnung B						
	Extinktion		H 1		H 2	
Versuchsmin.	2o	12o	2o	12o	2o	12o
Kontrolle	o,26	1,22				
BG 1γ/ccm	o,o9	o,52	62	53	62	52

Tab. 19. Bienengiftwirkung in den Anordnungen C und D. (Versuchsdauer: 1 Std.; C 1 = Werte eines Fermentpräparates, das 2 Stunden im Thermostaten bei 37° C belassen war, bevor es n. Anordn. C zum Versuch kam; H = Durchschnitt der Hemmung der Formazanbildung)

	Anordnung C		Anordnung C 1		Anordnung D	
	Extinkt	H	Extinkt	H	Extinkt	H
Kontrolle	o,84		o,61		o,63	
BG 1ooγ/ccm	o,18	78,5	o,13	78,8	o,1o5	83,4
BG 1oγ/ccm	o,3o	64	o,2o5	66	o,175	72,2
BG 1γ/ccm	o,47	44	o,33	45,5	o,265	58
BG o,1γ/ccm	o,72	14	o,52	15	o,38	4o

Tab. 2o. Wirkung des Giftes von Naja naja auf die Formazanbildung. (Versuchsanordnung A)

	Extinktion		Hemmung in %
Versuchsminuten	6o	12o	12o
Kontrolle	1,o4	1,82	
Gift 2oγ/ccm	o,35	o,56	69
Gift 4γ/ccm	o,46	o,78	57
Gift 2γ/ccm	o,53	o,865	53
Gift 1γ/ccm	o,61	o,93	51
Gift o,2γ/ccm	o,74	1,22	33
Gift o,1γ/ccm	o,78	1,32	27
Gift o,o2γ/ccm	1,o4	1,68	7,5
Gift o,oo2γ/ccm	1,o4	1,82	o,o

Tab. 21. Wirkung des Giftes von Naja naja. (Anordnung A und E)

Anordnung A.						
	Extinktionswerte			Hemmung in %		
Vers. min.	2o	6o	12o	2o	6o	12o
Kontrolle	o,46	1,16	2,o7			
Gift 1γ/ccm	o,29	o,65	1,1o	37	44	47
Anordnung E						
	Extinktionswerte			Hemmung in %		
Vers. min.	2o	6o	12o	2o	6o	12o
Kontrolle	o,44	1,1o	1,95			
Gift 1γ/ccm	o,15	o,47	o,82	66	58	58

Tab. 22. Wirkung des Giftes von Naja flava. (Anordnung A u. E)

Anordnung A.						
	Extinktionswerte			Hemmung in %		
Vers. min.	2o	6o	12o	2o	6o	12o
Kontrolle	o,46	1,16	2,o7			
Gift 1γ/ccm	o,46	1,14	1,9o	o	o	8
Anordnung E.						
	Extinktionswerte			Hemmung in %		
Vers. min.	2o	6o	12o	2o	6o	12o
Kontrolle	o,44	1,1o	1,95			
Gift 1γ/ccm	o,3o	o,79	1,38	32	28	29

Tab. 23. Wirkung des Giftes v. Lachesis muta. (Anordn. A u. E)

Anordnung A						
	Extinktionswerte			Hemmung in %		
Vers. min.	2o	6o	12o	2o	6o	12o
Kontrolle	o,22	o,58	1,18			
Gift 1γ/ccm	o,22	o,58	1,o6	o	o	1o
Anordnung E						
	Extinktionswerte			Hemmung in %		
Vers. min.	2o	6o	12o	2o	6o	12o
Kontrolle	o,21	o,55	1,o6			
Gift 1γ/ccm	o,12	o,34	o,6o	43	38	43

Tab. 24. Wirkung des Giftes von Bothrops yararaca. (Anordnung A und E)

	Anordnung A				Anordnung E			
	Extinktion		Hemmung in %		Extinktion		Hemmung in %	
Vers. min.	2o	12o	2o	12o	2o	12o	2o	12o
Kontrolle	o,4o	1,76			o,29	1,24		
Gift 1γ/ccm	o,4o	1,68	o	4,5	o,17	o,9o	41	27,5

Tab. 25. Wirkung des Giftes von Bothrops neuwiedii. (Anordnung A und E)

	Anordnung A				Anordnung E			
	Extinktion		Hemmung %		Extinktion		Hemmung in %	
Vers. min	2o	12o	2o	12o	2o	12o	2o	12o
Kontrolle	o,48	2,o2			o,38	1,46		
Gift 1γ/ccm	o,465	1,58	3	21,7	o,25	o,92	34	37

Tab. 26. Wirkung des Giftes von Vipera berus. (Anordn. A u. E)

	Anordnung A				Anordnung E			
	Extinktion		Hemmung %		Extinktion		Hemmung %	
Vers. min.	2o	12o	2o	12o	2o	12o	2o	12o
Kontrolle	o,48	2,o2			o,38	1,46		
Gift 1γ/ccm	o,41	1,2o	14,5	4o,5	o,18	o,82	52,5	44

Tab. 27. Wirkung des Giftes von Crotalus terrificus. (Anord. A)

	Extinktion					Durchschnitt d. Hemm. in %				
Vers. min.	1o	3o	6o	12o	24o	1o	3o	6o	12o	24o
Kontrolle	o,26	o,57	1,o1	1,68	2,6o					
Gift 1γ/ccm	o,22	o,39	o,6o	o,98	1,56	15	31	41	42	4o

Tab. 28. Wirkung verschiedener Schlangengifte im Vergleich zum Bienengift. (Anordn. C; 2-Std.-Werte; Kontrollext. 1,52)

	5oγ/ccm		5γ/ccm		o,5γ/ccm	
Gifte	Ext.W.	Hemm.%	Ext.W.	Hemm.%	Ext.W.	Hemm.%
Bienengift	o,64	58	o,82	46	1,14	25
Naja naja	o,54	65	o,69	55	o,94	38
Naja tripudians	o,645	57,5	o,8o	47,5	1,o2	33
Naja flava	1,o	34	1,2o	21	1,43	6
Frakt. II d. Bienengift					o,88	42

Herrn Prof. Dr. Dr. W. Neumann darf ich ergeben für die Überlassung des Themas und für sein freundlich hilfreiches Entgegenkommen danken.

Herrn Dr. W. Schoetensack bin ich für die Einarbeitung in das Arbeitsgebiet und ebenfalls wie Herrn Dr. E. Habermann für wertvolle Anregungen verpflichtet.

Literaturverzeichnis.

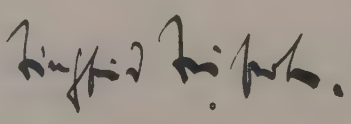
Bausback, G.	Inaug. Diss. Würzburg (1952)
Fleckenstein, A., Tippelt, H. und Kroner, H.	Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 21o, 38o, (195o)
Fleckenstein, A. Berg, G., Gayer, J. u. Schönig, S.	Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 213, 265, (1951)
Netzer, F.	Inaug. Diss. Würzburg (1952)
Neumann, W., E. Habermann u. G. Amend	Naturwissenschaften, 39, 286 (1952)
Röhl, I.	Inaug. Diss. Würzburg (1951)
Rudzko, H. D.	Inaug. Diss. Würzburg (195o)
Schoetensack, W.	Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 218, 1o7, (1953)
Timmermann, W. D.	Inaug. Diss. Würzburg (1951)

L e b e n s l a u f .

Am 30. Mai 1917 wurde ich als ältester Sohn des inzwischen verstorbenen Fabrikbesitzers Erich Seifert und seiner Ehefrau Marta, geborene Lau, in Eisfeld/Thür. geboren.
Nach Ablegung des Abiturs am humanistischen Gymnasium in Coburg 1936 trat ich in die aktive Offizierslaufbahn ein.
1947 begann ich das Studium der Zahnmedizin an der Universität Würzburg und legte dort 1951 das zahnmedizinische Staatsexamen ab.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.



Offsetdruck: BÖHLER Würzburg